

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500581

研究課題名(和文) ラット実験モデルによる拘縮時の組織変化に対する神経系の関与についての検討

研究課題名(英文) Influence of nerve system to the histopathological changes of joint contracture. A study using experimental spinal cord injury model in rat.

研究代表者

細 正博 (HOSO, Masahiro)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：20219182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラット脊髄損傷モデルにおける、関節構成体および坐骨神経周囲の病理組織学的変化について、キルシュナー鋼線を用いたラット膝関節拘縮モデルと比較した。結果、膝関節拘縮モデルで出現した、関節構成体の進行性の病的変化は、脊髄損傷モデルではほとんど見られなかった。一方、坐骨神経周囲の変化は類似していた。この結果から、拘縮時の関節構成体の病的変化には、体性神経and/or自律神経の何らかの関与が示唆される。

研究成果の概要(英文)：The histopathological changes of the joint components and the periphery of sciatic nerve after experimental spinal cord injury in rat were disclosed. The changes of the joint components were slight and stayed, compare to the changes during experimental joint contracture using Kirschner wires in rat. On the contrast, the changes of the periphery of sciatic nerve were similar to the changes during experimental joint contracture using Kirschner wires in rat. The results suggest some influence of somatic nerve and/or autonomic nerve function, to the mechanism of joint contracture state.

研究分野：理学療法学

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：拘縮 末梢神経切断 創外固定 関節構成体

1. 研究開始当初の背景

長期臥床や関節の安静固定等引き起こされる関節可動域制限(以下、拘縮)は、理学療法学にとって最も頻度の高い治療対象の一つであり、最重要の研究課題の一つと考えられる。

近年の動物実験モデルを用いた多くの研究により、拘縮初期には筋性の要素が、2週以上の不動/免加では関節性の要素が主因となること(Trudel. et.al.:*Contractures Secondary to Immobility: Is the Restriction Articular or Muscular? An Experimental Longitudinal Study in the Rat Knee. Arch Phys Med Rehabil, 81:6-13, 2000*)、筋性拘縮は筋節長の短縮と筋内膜コラーゲンに由来する粘弾性の変化が原因と考えられること(Okita. et.al.:*Effects of reduced joint mobility on sarcomere length, collagen fibril arrangement in the endomysium, and hyaluronan in rat soleus muscle. J Muscle Res Cell Motil. 2004;25(2):159-66*)、関節性拘縮は関節包および滑膜、脂肪体の線維化、関節腔の狭小化、軟骨の癒着によること(渡邊、他:*関節拘縮における関節構成体の病理組織学的変化 - ラット膝関節長期固定モデルを用いた検討 -、理学療法科学、22(1):67-75, 2007*)、軟部組織性拘縮は、真皮組織の密性化、筋間脂肪の線維化(松崎、他:*ラット膝関節モデルにおける大腿部筋間脂肪織の病理組織学的変化、理学療法科学 24(6):901-905, 2009*)、また筋及び関節構成体以外でも、神経周囲組織の接着、線維化の影響が考えられる事(吉田、他:*ラット膝関節拘縮 2週間後における坐骨神経周囲の病理組織学的変化、理学療法科学 24(2):287-291, 2009*)、等が主張されるようになり、拘縮の病態は次第に解明されつつあると考えられる。

これらのうち、平成 20 年度科学研究費補助金にて当研究者が明らかにしてきた軟部組織性拘縮の病理組織学的変化は、多くの点で関節性拘縮の変化との共通点が見られ、類

似のメカニズムが働いている可能性が指摘できる。このメカニズムについては、遺伝子レベルでの適応が起こったとする仮説(mechanotransduction 仮説 Trudel, et. al.:*Localized and Adaptive Synoviocyte Proliferation Characteristics in Rat Knee Joint Contractures Secondary to Immobility. Arch Phys Med Rehabil, 84,1350-1356, 2003*)、あるいは代謝 set point が変更された結果とする仮説(setpoint 仮説 Hildebrand, et. al.:*Joint Capsule Matrix Turnover in a Rabbit Model of Chronic Joint Contracture: Correlation with Human Contractures, J. Orthop. Res., 1036-1043, 2006*)等が提唱されているが、なお不明のままである。

2. 研究の目的

新たに開発したラット脊髄損傷モデル及び末梢神経切断モデルと、キルシュナー鋼線を用いた従来の膝関節創外固定による拘縮モデルを組み合わせる事で、拘縮時の各組織に対する体性神経の影響の有無、あるいは自律神経の影響の有無を検討し、拘縮による組織変化、とりわけ関節構成体及び軟部組織の変化に対する何らかの神経系の関与の有無を明らかにする。またこれにより、先に紹介した mechanotransduction 仮説、setpoint 仮説の、それぞれの正否を検討する。

3. 研究の方法

研究 1

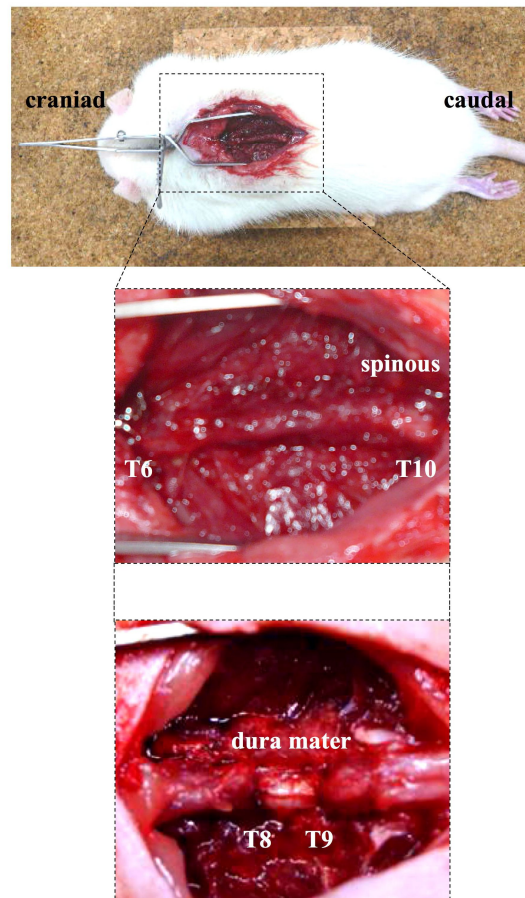
実験動物は 9 週齢の Wistar 系雌ラット 6 匹を使用した。無作為に選んだ 3 匹のラットに対して、椎弓切除後に T8-9 胸椎レベルを完全に離断し、次いで筋および皮膚を各々縫合し、脊髄損傷モデルを作成した。また、残りの 3 匹を対照群とした。脊髄損傷ラットに対しては、手圧排尿/排泄を毎日 2 回行った。また、全てのラットの飼育中には行動に制限を加えず自由に移動、摂食、飲水を可能とし

た環境設定とし、後肢関節の可動域を変化させるような介入は加えない事とした。2 週間の飼育終了後、実験動物を深麻酔後、可及的速やかに両側の後肢を股関節から離断し、皮膚を剥離して標本として採取した。採取後は 10%中性緩衝ホルマリン溶液にて組織固定を行い、Plank Rychlo 液にて脱灰操作を行った。その後、標本を大腿部の中間部にて大腿骨長軸を垂直に切断し、大腿部断面標本を採取した。次いで 5%無水硫酸ナトリウム液にて中和操作を行い、脱脂および脱水操作後にパラフィン包埋を行った。標本を滑走式マイクロームにて 3 μ m にて薄切した後に、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡下で坐骨神経周囲の観察を行った。脊髄損傷後 2 週の脊髄損傷群と同週齢の対照群の観察肢は、各 3 匹 6 肢とした。本実験は、金沢大学動物実験委員会の承認（実験承認番号 AP-081147）を得て行われた。なお、飼育方法に関しては金沢大学宝町地区動物実験指針に基づいて行われた。

研究 2

実験動物は 9 週齢の Wistar 系雌ラット 30 匹を使用した。無作為に T8-9 胸椎レベルを完全に離断した脊髄損傷群と対象群の 2 群に 15 匹ずつに振り分けた。ラットの飼育中は行動に制限を加えず自由に移動、摂食、飲水を可能とした環境設定とした。脊髄損傷群に対しては、手圧排尿/排泄を毎日 2 回行った。また、後肢関節の可動域を変化させる介入は加えない事とした。飼育終了後、深麻酔下にて可及的に後肢を股関節にて離断して採取した。採取後は 10%中性緩衝ホルマリン溶液にて組織固定後に脱灰し、膝関節を矢状断にて切り出しを行い、次いで中和、パラフィン包埋を行った。標本をマイクロームにて 3 μ m にて薄切した後に、ヘマトキシリンエオジン染色を行い、光学顕微鏡下で膝関節の滑膜、関節軟骨および脂肪体の観察を行った。観察

時期は、損傷後 1、2、4、8 および 12 週で、各 3 匹 6 肢とした。また、対照群は、各脊髄損傷群の同週齢で各 3 匹 6 肢とした。なお、本実験は金沢大学動物実験委員会の承認を得て行われた。



4 . 研究成果

研究 1

対照群では、坐骨神経内の神経束は神経周膜と遊離しており、神経束と神経周膜の間に空間を認めた。また、神経周膜そのものも同心円状の多層構造を示していた。これに対して脊髄損傷群では神経束と神経周膜最内層の密着が観察された（6 肢中 6 肢）が、同心円状に配置する神経周膜間には、密着傾向を示す例（6 肢中 3 肢）とそうでない例（6 肢中 3 肢）が見られた。

研究 2

脊髄損傷各群では損傷翌日には弛緩性麻痺を認め、損傷2週からは、接触刺激により移動時などで痙性もしくは反射様の動作が後肢全体に認められた。損傷1週での滑膜では、微小血管の拡張およびうっ血像、滑膜の乳頭状増生が確認された。損傷2週では、軽度の小型リンパ球の浸潤を認めた。これらの変化は損傷2週でさらに進行し、増加を認めたが、損傷4週では減少に転じ、8週、12週では減少された状態が維持されていた。関節軟骨の状態として、損傷1週において紡錘型細胞からなる膜状の組織が大腿骨および脛骨の軟骨表面を覆うように増生を認めた。この増生は損傷2週でさらに進展を認めたが、損傷4週では損傷2週と同様でそれ以上の増生を認めなかった。損傷8週および12週では、増生変化の減少を認めていた。損傷1週の脂肪細胞は、対象群と比較して脂肪細胞に変化を認めなかった。損傷2週では脂肪細胞の萎縮および線維化を認めた。損傷4週では正常化傾向に転じ、損傷8週および12週の脂肪細胞は、軽度の萎縮で維持されていた。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kitade I, Hoso M, Matsuzaki T, Inaoka PT, Kamijo A, Araki Y, Takahashi II
Histopathological Changes in Knee Joint Component after Spinal Cord Injury in Rats
J. Phys. Ther. Sci. 24(1):31-35, 2012
<http://dx.doi.org/10.1589/jpts.24.31>

Kitade I, Hoso M, Matsuzaki T, Yoshida S, Kamijo A, Araki Y, Takahashi II
Histopathological changes in surrounding tissue of the sciatic nerve after spinal cord injury in rats.

J. Phys. Ther. Sci. 24(9):817-820, 2012
<http://dx.doi.org/10.1589/jpts.24.817>

〔学会発表〕(計 7 件)

Yoshida S, Matsuzaki T, Otoji T, Sato E, Terashima M, Togashi K, Hoso M
Effect of Exercise during Knee Joint Immobilization on the periphery of the Sciatic Nerve of Rats
6th WCPT-AWP & 12th ACPT Congress 2013
Sep. 5-9, 2013 Nan Shan Education & Training Center (Taiwan)

Matsuzaki T, Ishii K, Tanaka W, Yoshida S, Hoso M
Influence of Peripheral Nerve Injury on the Joint Immobilization
6th WCPT-AWP & 12th ACPT Congress 2013
Sep. 5-9, 2013 Nan Shan Education & Training Center (Taiwan)

細 正博

動物実験モデルによる関節拘縮の病理組織学

第17回福井県理学療法学会特別講演

サンドーム福井管理会議棟(福井県)
2013年3月9日

北出 一平, 細 正博, 松崎 太郎, 上條 明生, 荒木 督隆, 高橋 郁文

ラット脊髄損傷後2週における坐骨神経周囲の病理組織学的検討

第47回日本理学療法学会 神戸ポートピアホテル・神戸国際展示場(兵庫)
2012年5月25日~2012年5月28日

田中 渉, 松崎 太郎, 細 正博

関節固定の有無によるラット末梢神経切断モデルの関節構成体の病理組織学

的变化

第 47 回日本理学療法学会 神戸ポ
ートピアホテル・神戸国際展示場(兵庫)
2012 年 5 月 25 日～2012 年 5 月 28 日

吉田 信也, 松崎 太郎, 音地 利亮, 佐藤
絵美, 寺島 未菜, 藤樫 和彦, 守山 成則,
細 正博

関節不動期間中の関節可動域運動の違
いが坐骨神経周囲組織に与える影響

第 47 回日本理学療法学会 神戸ポ
ートピアホテル・神戸国際展示場(兵庫)
2012 年 5 月 25 日～2012 年 5 月 28 日

北出一平, 細 正博, 松崎太郎, 上條明
生, 荒木督隆, 高橋郁文

ラット脊髄損傷における坐骨神経周囲
組織の横断的検討

第 2 回基礎理学療法学会 兵庫医療大学
(兵庫) 2012 年 5 月 24 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細 正博 (HOSO, Masahiro)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号: 20219182

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし